

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ
(РОСПАТЕНТ)



ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ
ПРОМЫШЛЕННОЙ СОБСТВЕННОСТИ

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-5, 123995
Телефон 240 60 15. Телекс 114818 ПДЧ. Факс 243 33 37

2003

PCT / RU 03 / 0043743

10/534238

REC'D 01 MAR 2004

WIPO

PCT

Наш № 20/12-45

«29» января 2004 г.

СПРАВКА

Федеральный институт промышленной собственности (далее – Институт) настоящим удостоверяет, что приложенные материалы являются точным воспроизведением первоначального описания, формулы, реферата и чертежей (если имеются) заявки № 2003123534 на выдачу патента на изобретение, поданной в Институт в июле месяце 29 дня 2003 года (29.07.2003).

Название изобретения:

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

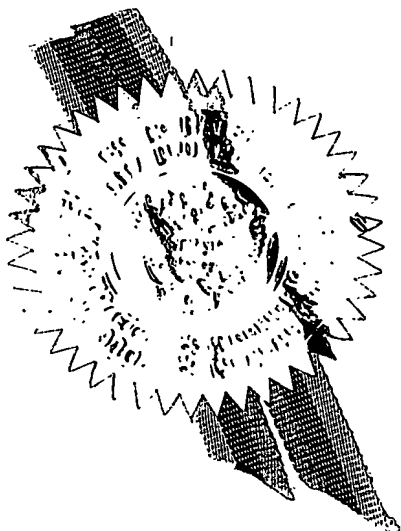
Рекомбинантная плазмидная ДНК pET23-a(+)/
PrxVIhumΔ178, кодирующая N-концевой фрагмент
пероксиредоксина VI человека, и штамм бактерий
Escherichia coli / pET23-a(+)/PrxVIhumΔ178- проду-
цент N-концевого фрагмента пероксиредоксина VI
человека

Заявитель:

Институт биоорганической химии им.М.М.Шемякина
и Ю.А.Овчинникова РАН
Институт биофизики клетки РАН

Действительные авторы:

ЛИПКИН Валерий Михайлович
ШУБАЕВА Татьяна Маратовна
РАДЧЕНКО Виталий Владиславович
МЕРКУЛОВА Мария Игоревна
НОВОСЕЛОВ Владимир Иванович
ФЕСЕНКО Евгений Евгеньевич



Заведующий отделом 20

А.Л.Журавлев

2003123534



РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЛАЗМИДНАЯ ДНК pET23-a(+)/ *PrxVIhumΔ178*,
КОДИРУЮЩАЯ N-КОНЦЕВОЙ ФРАГМЕНТ ПЕРОКСИРЕДОКСИНА VI
ЧЕЛОВЕКА, И ШТАММ БАКТЕРИЙ *Escherichia coli* / pET23-a(+)/
PrxVIhumΔ178—ПРОДУЦЕНТ N-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА
ПЕРОКСИРЕДОКСИНА VI ЧЕЛОВЕКА

Изобретение относится к области биотехнологии, генной инженерии и может быть использовано для получения антиоксидантного препарата пероксиредоксина, предназначенного для лечения заболеваний, связанных с окислительным стрессом.

Известно, что при неполном восстановлении молекулярного кислорода в процессе клеточного дыхания образуются активные формы кислорода - супероксидный анион радикал (O_2^-), перекись водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал ($HO\cdot$), которые являются крайне токсичными для клеток. Аэробные организмы выработали защитные механизмы для обезвреживания этих веществ. Одним из таких защитных механизмов является восстановление активных форм кислорода в результате реакций, катализируемых ферментами - антиоксидантами. Эти белки играют важную роль в поддержании окислительно-восстановительного потенциала клетки. К ним относятся такие хорошо изученные антиоксиданты, такие, как супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, а, кроме того, открытые в последнее десятилетие пероксиредоксины [Chae H.Z., Robison K., Poole L.B., Church G., Storz G., and Rhee S.G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 91, 7017-7021].

Пероксиредоксины – новое семейство белков, которое в настоящее время насчитывает более 100 представителей, обнаруженных во всех живых

Замечено
(подпись)
13.10.03

ДПН 19.09.03

организмах от архебактерий до человека и являющихся тиоловыми пероксидазами [Lee S.P., Hwang Y.S., Kim Y.J., Kwon K.S., Kim H.J., Kim K., Chae H.Z. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 29826-29832].

У млекопитающих выявлено 6 типов пероксиредоксинов, различающихся по аминокислотной последовательности, механизму действия и локализации в организме и в клетке. Все пероксиредоксины в своей последовательности содержат высоко консервативный участок, являющийся активным центром ферментов, в состав которого входят один или два остатка Cys. В тестах *in vitro* было показано, что пероксиредоксины предотвращают инактивацию глутаминсинтетазы в присутствии Fe^{3+} , O_2 и дитиотреитол (ДТТ) - модельной окислительной системе, генерирующей свободные радикалы [Kim K., Kim I.H., Lee K.Y., Rhee S.G., Stadtman E.R. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 4704-4711].

К настоящему времени 1-Cys пероксиредоксин (пероксиредоксин VI, PrxVI) идентифицирован во многих органах и тканях млекопитающих. Первые природные индивидуальные белковые препараты PrxVI млекопитающих были выделены из обонятельного эпителия [Peshenko I.V., Novoselov V.I., Evdokimov V.A., Nikolaev Yu.V., Shuvaeva T.M., Lipkin V.M., Fesenko E.E. (1996) *FEBS Letters*, **381**, 12-14] и легких крысы [Kim T.S., Sundaresh C.G., Feinstein S.I., Dodia C., Skach W.R., Jain M.R., Nagase T., Seki N., Isherawa K., Nomura N., Fisher A.B. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 2542-2550]. Эти способы включают в себя накопление и гомогенизацию ткани, экстракцию целевого белка, а также тонкое фракционирование препарата с помощью трёх последовательных хроматографических стадий. И хотя ткани, непосредственно контактирующие с кислородом воздуха, наиболее обогащены PrxVI [Novoselov S.V., Peshenko I.V.,

Popov V.I., Novoselov V.I., Bystrova M.F., Evdokimov V.J., Kamzalov S.S., Merkulova M.I., Shuvaeva T.M., Lipkin V.M., Fesenko E.E. (1999) *Cell Tissue Res.*, **298**, 471-480], эти трудоёмкие и промышленно невоспроизводимые способы имеют лишь теоретическое значение. Основными недостатками получения PrxVI из природных источников являются: необходимость накопления животных тканей, малый конечный выход чистого препарата (0,01 мг на одно животное) и возможность возникновения аллергических реакций при использовании чужеродного белка для лечения человека.

В настоящее время препаративные количества PrxVI млекопитающих получают более предпочтительными генноинженерными методами, позволяющими набирать нужные количества однородного генетического материала (выбранного вектора, соединённого со структурным геном полипептида) и, как следствие, конечного продукта – белка.

Так, в клетках штамма *E. coli* BL21(DE3) был осуществлён биосинтез полноразмерного рекомбинантного PrxVI человека (PrxVIhum) [Chen L.-W., Dodia C., Feinstein S. I., Jain M. K., Fisher A.B. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 28421-28427]. Для этого был взят фрагмент кДНК PrxVIhum (PrxVIhum) HA0683 (GenBank™ D14662) длиной 1653 п.о., содержащий открытую рамку считывания для PrxVIhum (224 а.о.) размером 672 п.о. Большая часть исходного фрагмента (длиной 1044 п.о.) была встроена в экспрессирующий вектор pET28с по сайту рестрикции *HindIII*. Полученная конструкция обеспечивала наработку рекомбинантного белка, который, наряду с аминокислотной последовательностью PrxVIhum, содержал 42 дополнительных аминокислотных остатка, включая шесть остатков His на N-конце полипептидной цепи белка. Взяв за основу тот же фрагмент ~~PrxVIhum~~ и искусственно введя сайты для узнавания

рестриктаз *NdeI* и *XhoI*, авторы амплифицировали кодирующую область. Полученный фрагмент был клонирован по этим сайтам в экспрессирующий вектор pET21b. В результате, рекомбинантный белок, биосинтез которого детерминировала эта плазмида, содержал только два дополнительных аминокислотных остатка, помимо шести остатков His на С-конце полипептидной цепи продукта. После трансформации *E. coli* полученными рекомбинантными ДНК и индукции экспрессии генов изопропилтиогалактозидом (ИПТГ) клетки наращивали в течение 6 ч и разрушали; белковые препараты подвергали последовательной очистке хроматографическими методами. К недостаткам обоих полученных продуктов можно отнести то, что, хотя и введение в состав полипептидной цепи дополнительных остатков His значительно упрощает выделение рекомбинантных белков, такого рода модификации заметно сдвигают изоэлектрическую точку белковых продуктов по сравнению с природным и, как следствие, меняют их электростатическое окружение. Кроме того, введение дополнительных аминокислотных остатков (42-х в первой конструкции и 2-х – во второй), увеличивает молекулярную массу продукта и, как следствие, ухудшает его проникновение в клетку.

Экспрессия рекомбинантного PrxVI была осуществлена также в бакуловирусной системе [Fujii T., Fujii J., Taniguchi N. (2001) *Eur. J. Biochem.*, 268, 218-224]. Для этого из различных тканей крысы была выделена смесь мРНК, по которой обратной полимеразной реакцией синтезировали комплементарную цепь ДНК. Затем эту кДНК субклонировали в бакуловирусный челночный вектор pVL1392. Полученная конструкция обеспечивала наработку полноразмерного PrxVI крысы при инфекции

эукариотических клеток Sf21. С помощью высаживания, фракционированием на ионообменной смоле с последующими стадиями гель-фильтрации функционально активный рекомбинантный белок был выделен из культуральной жидкости этих клеток. К недостаткам этого метода можно отнести длительность получения (5 дней) препарата, необходимость использования дорогостоящих питательных сред, невысокий по сравнению с бактериальными системами выход целевого продукта и возможность возникновения побочных аллергических реакций при использовании в лекарственных композициях крысиного PrxVI.

Наиболее близким по технической сущности к предлагаемому изобретению является полипептид массой 25034 Да, представляющий собой полноразмерный рекомбинантный PrxVI_{hum} и кодирующая его рекомбинантная плазмидная ДНК pET23-a(+)/PrxVI_{hum} [Меркулова М.И., Шуваева Т.М., Радченко В. В., Янин В.А., Бондарь А.А., Софин А.Д., Липкин В.М. (2002) *Биохимия*, 67, 1496-1501]. Получаемый пероксиредоксин обладает высокой антиоксидантной активностью. Однако высокая молекулярная масса, препятствующая проникновению молекулы антиоксиданта в клетки организма человека, ограничивает его применение.

Задачей предлагаемого изобретения является конструирование плазмиды, детерминирующей синтез укороченного полипептида PrxVI_{hum}, сохраняющего антиоксидантную активность полноразмерного PrxVI_{hum}, а также создание высокопродуктивного штамма-продуцента для получения полипептида пероксиредоксина человека VI, являющегося N-концевым фрагментом PrxVI_{hum}.

Поставленная задача решается за счет конструирования рекомбинантной плазмидной ДНК рЕТ23-а(+)/*PrxVIhumΔ178*, кодирующей N-концевой фрагмент пероксиредоксина VI человека с молекулярной массой 19691,61 Да, содержащей *EcoRI*-*NdeI*-фрагмент плазмиды рЕТ23-а(+), включающий промотор РНК-полимеразы фага Т7, участок инициации репликации (*ori*) и терминатор транскрипции рибосомального оперона *E.coli*, *NdeI-EcoRI* – фрагмент длиной 552 п.о. с последовательностью *PrxVIhumΔ178*, генетический маркер - *Ap*, детерминирующий устойчивость трансформированных плазмидой рЕТ23-а(+)/*PrxVIhumΔ178* клеток *E.coli* к ампициллину, уникальные сайты узнавания рестрикционными эндонуклеазами со следующими координатами: *NdeI*-790, *EcoRI*-192, *PvuII*-1531, а также за счет штамма *E. coli* BL21/DE3/рЕТ23-а(+)/*PrxVIhumΔ178*– продуцента N-концевого фрагмента пероксиредоксина VI человека, обеспечивающего синтез N-концевого фрагмента *PrxVIhum* размером 179 аминокислотных остатков (*PrxVIhumΔ178*) с уровнем экспрессии в 30% от суммарного клеточного белка (30 мг/л культуральной жидкости).

Преимуществом заявленного технического решения является возможность получения антиоксиданта – пероксиредоксина VI человека с сохранением антиоксидантной активности полноразмерного пероксиредоксина при пониженной молекулярной массе, что обеспечивает проникновение препарата в клетки организма человека.

Исходной плазмидой для конструирования новой последовательностей ДНК, кодирующей полипептид *PrxVIhumΔ178*, служит плазида рЕТ23-а(+)/*PrxVIhum*, детерминирующая экспрессию полноразмерного рекомбинантного *PrxVIhum*. Эту плазмиду конструируют на основе векторной плазмиды рЕТ23-а(+)

[Studier, F.W., Moffatt, B.A. (1986) *J. Mol. Biol.*, **189**, 113-130].

Фрагмент *PrxVIhum*, предназначенный для клонирования с сохранением рамки считывания в экспрессирующем векторе, получают методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) [Taylor G.

In: Polymerase Chain Reaction. A Practical Approach, v.1, McPherson M.J., Quirke P., Taylor G. R. eds. Oxford Univ. Press. Oxford. 1994] с использованием в

качестве праймеров олигонуклеотидов, в последовательности которых введены точечные замены для создания соответствующих участков рестрикции. В

качестве прямого праймера используют 5'-ATCACCGTCCATATGCCCCGGAGG-

3'(подчеркнут сайт узнавания рестриктазы *NdeI*), в качестве обратного –

5'-CCAGAATTCTTAAGGCTGGGGTGTG-3' (подчеркнут участок узнавания

рестриктазы *EcoRI*). В качестве матрицы для проведения ПЦР используют

плазмиду, содержащую последовательность *PrxVIhum* HA0683 (GenBank™

D14662). Реакционная смесь для проведения ПЦР содержит (в объеме 50 мкл): 1

нг плазмидной ДНК, 20 пмоль каждого праймера, 5 мкл буфера для ПЦР

фирмы «Promega», 200 мкМ каждого dNTP, 5 единиц Taq-полимеразы.

Реакцию начинают со стадии предварительной денатурации ДНК – 94°C, 5 мин,

затем проводят 30 циклов ПЦР при следующих параметрах температурного

цикла: денатурация – 30 с при 94°C, отжиг с праймерами – 30 с при 60°C,

элонгация – 45 с при 72°C с последующей инкубацией при 72°C в течение 5

мин. После обработки продукта реакции соответствующими рестриктазами

PrxVIhum клонируют в плазмиду pET23-a(+) по сайтам *NdeI-EcoRI*.

Рекомбинантная плазмидная ДНК pET23-a(+)/*PrxVIhum*Δ178

характеризуется следующими признаками:

имеет размер 4210 п.о.

кодирует N-концевой фрагмент PrxVIhum длиной 179 а.о.

состоит из: *EcoRI*-*NdeI*-фрагмента плазмиды рЕТ23-а(+), включающего промотор РНК-полимеразы фага Т7, участок инициации репликации (*ori*) и терминатор транскрипции рибосомального оперона *E.coli*, *NdeI*-*EcoRI* – фрагмента длиной 552 п.о. с последовательностью, кодирующей PrxVIhumΔ178.

содержит: генетический маркер - Ap, детерминирующий устойчивость трансформированных плазмидой рЕТ23-а(+)/PrxVIhumΔ178 клеток *E.coli* к ампициллину, а так же уникальные сайты узнавания рестрикционными эндонуклеазами со следующими координатами: *NdeI*-790, *EcoRI*-192, *PvuII*-1531.

Преимущества предложенной конструкции достигаются за счёт того, что входящий в ее состав фрагмент PrxVIhumΔ178, кодирует укороченный по сравнению с PrxVIhum полипептид, сохраняющий антиоксидантную активность природного белка. Это, во-первых, упрощает хроматографическую очистку PrxVIhumΔ178; во-вторых, делает более технологичным его использование в составе лечебных композиций за счет лучшей проницаемости в ткани и увеличения времени циркуляции с биологическими жидкостями по сравнению с полноразмерным белком; в-третьих, увеличивает долю целевого продукта в общей биомассе штамма-продуцента, что, в свою очередь, ведет к снижению себестоимости конечного продукта.

Для получения штамма-продуцента полипептида PrxVIhumΔ178 компетентные клетки *E. coli* BL21/DE3 трансформируют рекомбинантной плазмидной ДНК рЕТ23-а(+)/PrxVIhumΔ178.

Полученный штамм *E. coli* BL21/DE3/pET23-a(+)/PrxVIhumΔ178

характеризуется следующими признаками.

Морфологические признаки: клетки мелкие палочковидной формы, грамотрицательные, неспороносные, 1х3,5 мкм, подвижные.

Культуральные признаки: при росте на агаризованной среде LB колонии круглые, гладкие, полупрозрачные, блестящие, серые. Край ровный, диаметр колоний 1-3 мм, консистенция пастообразная. Рост в жидких средах (LB, минимальная среда с глюкозой) характеризуется ровным помутнением, осадок легко седиментирует.

Физико-биохимические признаки: клетки растут при 4-42°C, оптимум pH 6,8-7,6. В качестве источника азота используют как минеральные соли азота, так и органические соединения: аминокислоты, пептон, триптон, дрожжевой экстракт. В качестве источника углерода при росте на минимальной среде используют глицерин, углеводы, аминокислоты.

Устойчивость к антибиотикам: клетки штамма-продуцента проявляют устойчивость к ампициллину (до 300 мг/мл), обусловленную наличием в плазмиде гена β-лактамазы (bla).

На фиг. 1 представлена нуклеотидная последовательность *NdeI-EcoRI*-фрагмента плазмиды pET23-a(+)/PrxVIhumΔ178 и кодируемая им аминокислотная последовательность полипептида PrxVIhumΔ178; на фиг. 2 – физическая карта полученной плазмиды; на фиг. 3 – результаты сравнительного исследования протекторных свойств рекомбинантного полноразмерного PrxVI человека и его N-концевого фрагмента (PrxVIhumΔ178) по защите глутаминсинтетазы *E. coli* от инактивации в модельной окислительной системе *in vitro*.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Конструирование рекомбинантной плазмидной ДНК рЕТ23-a(+)/*PrxVIhum* Δ 178, кодирующей N-концевой фрагмент Prx VI человека.

Используют фрагмент кДНК *Prx VI* человека, который ранее был клонирован с сохранением рамки считывания в экспрессирующем векторе [Меркулова М.И., Шуваева Т.М., Радченко В. В., Янин В.А., Бондарь А.А., Софин А.Д., Липкин В.М. (2002) *Биохимия*, 67, 1496-1501]. Этот вектор, рЕТ23-a(+)/*PrxVIhum*, используют в качестве матрицы для ПЦР. Полученный таким образом фрагмент ДНК кодирует N-концевой фрагмент PrxVI длиной 179 аминокислотных остатков. В качестве прямого праймера на этой стадии используют 5'-GCG AAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG -3' (комплементарный промоторной области вектора рЕТ23-a(+)/*PrxVIhum*). В качестве обратного для *PrxVI* Δ 178 - 5'-CCA TCC TTC GAA TTC AAC TTA GGT GGC-3' (подчеркнут сайт рестриктазы *EcoRI*, выделен стоп-кодон). Реакционная смесь содержит (в объеме 50 мкл): ~ 1 нг плазмидной ДНК, 20 пмоль каждого праймера, 5 мкл буфера для ПЦР («Promega», США), 200 мкМ каждого dNTP, 5 единиц Taq-полимеразы. Реакцию начинают с предварительной денатурации ДНК при 94°C в течение 3 мин, затем проводят 10 циклов ПЦР при следующих параметрах температурного цикла: денатурация – 30 с при 94°C, отжиг с праймерами – 30 с при 55°C, элонгация – 45 с при 72°C, затем ещё 10 циклов реакции: денатурация – 30 с при 94°C, отжиг с праймерами – 30 с при 62°C, элонгация – 45 с при 72°C с последующей инкубацией при 72°C в течение 5 мин. После обработки соответствующими рестриктазами фрагмент *PrxVIhum* Δ 178 лигируют с *NdeI*-*EcoRI*-фрагментом плазмиды рЕТ23-a(+) с использованием ДНК-лигазы фага T4. Точность сборки конструкции проверяют рестрикционным анализом и

секвенированием полученной вставки по модифицированному методу Сенгера [Чемерис А.В., Ахунов Э.Д., Вахитов В.А. Секвенирование ДНК, М., «Наука», 1999.]. На фиг. 2 представлена физическая карта рекомбинантной плазмиды pET23-a(+)/*PrxVThum*Δ178.

Пример 2. Экспрессия *PrxVThum* Δ178 – фрагмента кДНК *PrxVI* человека.

Для экспрессии фрагмента *PrxVThum* в качестве штамма-хозяина выбирают штамм *E.coli* BL-21(DE-3), несущий в хромосоме ген РНК-полимеразы фага T7 под контролем индуцибельного *lac*-промотора [Studier F.W., Moffatt B.A. (1986) *J. Mol. Biol.*, **189**, 113-130]. Трансформацию компетентных клеток *E.coli* BL-21(DE-3) осуществляют химическим методом с использованием хлорида кальция [Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.-Y.]. Для наработки рекомбинантного белка клетки выращивают при 37°C до достижения в жидкой культуре значения поглощения A_{600} 0,6. Затем для индукции экспрессии белков добавляют индуктор *lac*-промотора ИПТГ до конечной концентрации 0,4 мМ и продолжают инкубацию еще 5 ч. После этого суспензию клеток подвергают центрифугированию. Осадок, содержащий клетки штамма-продуцента, разрушают ультразвуком и повторно центрифугируют. Белковую фракцию, содержащую в своем составе целевой продукт, высаживают насыщенным раствором $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и диализуют против 12 мМ Трис-НСl буфера (pH 7,8), в состав которого входят 1 мМ MgCl_2 и 1 мМ ДДТ. Белковую смесь хроматографируют на ДЭАЭ-сефарозе в градиенте хлорида натрия. Фракции, содержащие целевой полипептид, подвергают дальнейшей очистке с помощью гель-фильтрации на сефакриле S-200 и анализируют с помощью

полиакриламидного гель-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия.

Пример 3. Сравнение протекторных свойств рекомбинантного полноразмерного PrxV_{Hum} и его N-концевого фрагмента PrxV_{Hum}Δ178 по защите глутаминсинтетазы *E. coli* от инактивации в модельной окислительной системе *in vitro*.

Глутаминсинтетазу выделяют из клеток *E. coli* штамма DH5α [Streicher S.L., Tyler B. (1980) *J. Bacteriol.*, **142**, 69-78] и инактивируют в присутствии Fe³⁺, O₂ и ДТТ – в модельной окислительной системе, генерирующей свободные радикалы [Kim K., Kim I.H., Lee K.Y., Rhee S.G., Stadtman E.R. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 4704-4711]. Реакцию инактивации глутаминсинтетазы проводят в объеме 60 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкг фермента, 50 мМ Перес (pH 7,4), 3 мМ ДТТ и 3мкМ FeCl₃, в присутствии разных концентраций пероксиредоксина в течение 10 мин при 37°C. Затем определяют оставшуюся активность глутаминсинтетазы *E. coli*. Протекторные свойства пероксиредоксина по защите глутаминсинтетазы *E. coli* от инактивации определяют как отношение оставшейся активности фермента после инактивации в присутствии разных концентраций пероксиредоксина к активности неинактивированной глутаминсинтетазы. Результаты теста представлены на фиг. 3.

Пример 4. Определение продуктивности штамма-продуцента PrxV_{Hum}Δ178.

С целью улучшения аэрации в 5 мл жидкой среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, вносят индивидуальную колонию клеток *E. coli* BL21/DE3, содержащую сконструированную плазмиду pET23-a(+)/PrxV_{Hum}Δ178.

Выращивают при 37°C на качалке при 180 об/мин в течении 2,5 ч до достижения в жидкой культуре значения поглощения A_{600} 0,6. Затем добавляют ИПТГ до концентрации 0,4 мМ и продолжают инкубацию в тех же условиях в течении 6 ч. Отбирают пробу 1 мл и центрифугируют 5 мин при 6 000 об/мин, после чего клетки суспендируют в 100 мкл буфера, содержащего 125 мМ Трис-НСI (рН 6,8), 20% глицерина, 3% додецилсульфата натрия и 0,01% бромфенолового синего. Клеточную суспензию прогревают 10 мин на кипящей водяной бане. Отбирают образцы 2,5 мкл, 5мкл, 7,5 мкл, 10 мкл и 15 мкл и анализируют электрофорезом в 15%-ном полиакриламидном геле, содержащем 0,1% додецилсульфата натрия [Laemmli U.K. (1970) *Nature*, 227, 680-687]. Гель окрашивают Кумасси R-250 и сканируют на лазерном денситометре Ultrascan XL. По данным сканирования полипептид PrxVIhum Δ 178 составлял 30% суммарного клеточного белка, что соответствует выходу конечного чистого белкового продукта 30 мг/л культуры клеток.

Структура *NdeI-EcoRI* – фрагмента длиной 552 п.о. с последовательностью, кодирующей N-концевой фрагмент PrxVI человека PrxVI^{hum}Δ178 и соответствующая ей аминокислотная последовательность. Подчёркнут сайт узнавания рестриктазой *EcoRI*. Иницирующий и терминирующий кодоны выделены жирным шрифтом.

M P G G L L L G D V A P N F E A N T T
ATGCCCGGAGGTCTGCTTCTCGGGGACGTGGCTCCCAACTTTGAGGCCAATACCACC
TACGGGCTCCAGACGAAGAGCCCTGCACCGAGGGTTGAAACTCCGGTTATGGTGG

V G R I R F H D F L G D S W G I L F S
GTCGGCCGCATCCGTTTCCACGACTTTCTGGGAGACTCATGGGGCATTCTCTTCTCC
CAGCCGGCGTAGGCCAAAGGTGCTGAAAGACCCCTCTGAGTACCCCGTAAGAGAAGAGG

H P R D F T P V C T T E L G R A A K L
CACCTCGGGACTTTACCCAGTGTGCACCACAGAGCTTGGCAGAGCTGCAAAGCTG
GTGGGAGCCCTGAAATGGGGTCACACGTGGTGTCTCGAACCGTCTCGACGTTTTCGAC

A P E F A K R N V K L I A L S I D S V
GCACCAGAATTTGCCAAGAGGAATGTTAAGTTGATTGCCCTTTCAATAGACAGTGTT
CGTGGTCTTAAACGGTTCTCCTTACAATTCAACTAACGGGAAAGTTATCTGACACAA

E D H L A W S K D I N A Y N C E E P T
GAGGACCATCTTGCCTGGAGCAAGGATATCAATGCTTACAATTGTGAAGAGCCCACA
CTCCTGGTAGAACGGACCTCGTTCCTATAGTTACGAATGTTAACTTCTCGGGTGT

E K L P F P I I D D R N R E L A I L L
GAAAAGTTACSTTTTCCCATCATCGATGATAGGAATCGGGAGCTTGCCATCCTGTTG
CTTTTCAATGGAAAAGGGTAGTAGCTACTATCCTTAGCCCTCGAACGGTAGGACAAC

G M L D P A E K D E K G M P V T A R V
GGCATGCTGGATCCAGCAGAGAAGGATGAAAAGGGCATGCCTGTGACAGCTCGTGTG
CCGTACGACCTAGGTCGTCTCTTCTACTTTTCCCGTACGGACACTGTCGAGCACTC

V F V F G P D K K L K L S I L Y P A T
GTGTTTGTGTTTTGGTCTGATAAGAAGCTGAAGCTGTCTATCCTCTACCCAGCTACC
CACAAACAAAAACCAGGACTATTCTTCGACTTCGACAGATAGGAGATGGGTGCGATGG

T G R N F D E I L R V V I S L Q L T A
ACTGGCAGGAACSTTTGATGAGATTCTCAGGGTAGTCATCTCTCTCCAGCTGACAGCA
TGACCGTCCTTGAAACTACTCTAAGAGTCCCATCAGTAGAGAGAGGTGCGACTGTCGT

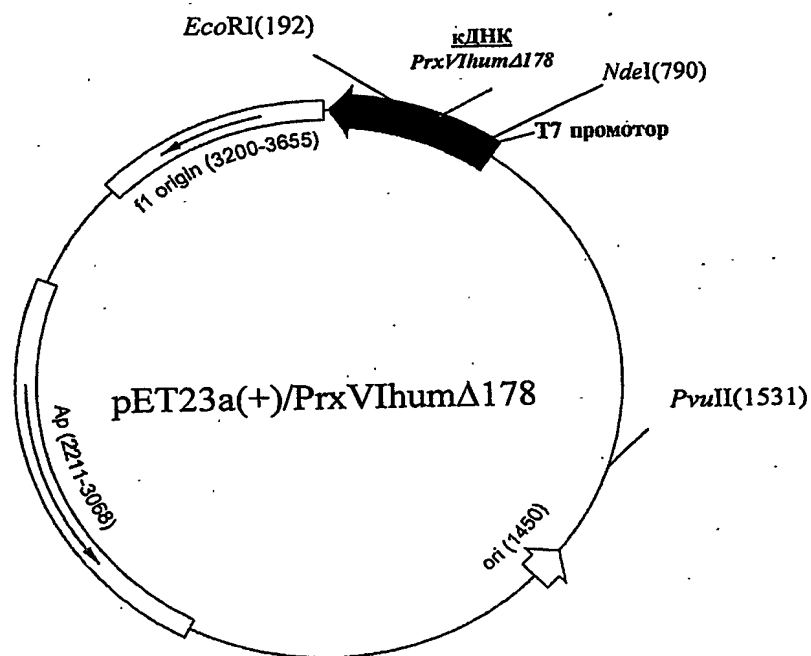
E K R V A T #
GAAAAAAGGGTTGCCACCTAAGTTGAATTCGAAGGATGG
CTTTTTTCCCAACGGTGGATTCAACTTAAGCTTCCTACC

Фиг. 1

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

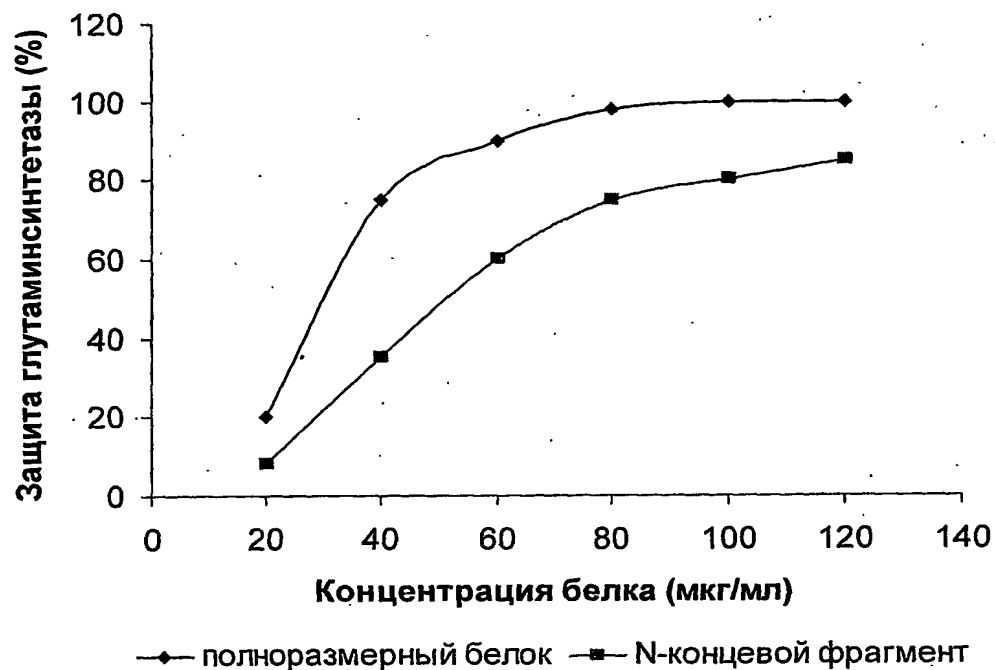
1. Рекомбинантная плазмидная ДНК *pET23-a(+)/PrxVIhumΔ178*, кодирующая N-концевой фрагмент пероксиредоксина VI человека с молекулярной массой 19691,61Да, содержащая *EcoRI*-*NdeI*-фрагмент плазмиды *pET23-a(+)*, включающий промотор РНК-полимеразы фага T7, участок инициации репликации (*ori*), генетический маркер (*Ap*), детерминирующий устойчивость трансформированных плазмидой *pET23-a(+)/PrxVIhumΔ178* клеток *E.coli* к ампициллину, уникальные сайты узнавания рестрикционными эндонуклеазами со следующими координатами: *NdeI*-790, *EcoRI*-192, *PvuII*-1531 и *NdeI-EcoRI* – фрагмент длиной 552 п.о. с последовательностью *PrxVIhumΔ178*.

2. Штамм *E. coli* BL21/DE3/*pET23-a(+)/PrxVIhumΔ178*– продуцент N-концевого фрагмента пероксиредоксина VI человека.



Физическая карта рекомбинантной плазмиды pET23-a(+)/PrxVIhumΔ178. Указаны сайты эндонуклеаз рестрикции. Ori – участок инициации репликации плазмиды. Ap – генетический маркер, детерминирующий устойчивость трансформированных плазмидой pET23-a(+)/PrxVIhumΔ178 клеток *E.coli* к ампициллину.

Фиг. 2



Сравнение протекторных свойств полноразмерного рекомбинантного пероксиредоксина VI человека (PrxVI_{hum}) и его N-концевого фрагмента PrxVI_{hum} Δ 178 по защите глутаминсинтетазы *E. coli* от инактивации в модельной окислительной системе *in vitro*.

Фиг. 3

РЕФЕРАТ

Изобретение относится к области биотехнологии и генной инженерии и может быть использовано для получения антиоксидантного препарата пероксиредоксина VI человека, предназначенного для лечения заболеваний, связанных с окислительным стрессом. Изобретение решает задачу конструирования плазмиды, детерминирующей синтез укороченного полипептида PrxVHum, сохраняющего антиоксидантную активность полноразмерного PrxVHum, также создания высокопродуктивного штамма-продуцента для получения полипептида пероксиредоксина человека VI, являющегося N-концевым фрагментом PrxVHum, за счет того, что рекомбинантная плазмидная ДНК рЕТ23-а(+)/PrxVHum Δ 178, кодирующая N-концевой фрагмент пероксиредоксина VI человека с молекулярной массой 19691,61Да, содержит *EcoRI*-*NdeI*-фрагмент плазмиды рЕТ23-а(+), включающий промотор РНК-полимеразы фага T7, участок инициации репликации (*ori*), генетический маркер (*Ap*), детерминирующий устойчивость трансформированных плазмидой рЕТ23-а(+)/PrxVHum Δ 178 клеток *E. coli* к ампициллину, уникальные сайты узнавания рестрикционными эндонуклеазами со следующими координатами: *NdeI*-790, *EcoRI*-192, *PvuII*-1531 и *NdeI*-*EcoRI* – фрагмент длиной 552 п.о. с последовательностью PrxVHum Δ 178, а также за счет штамма *E. coli* BL21/DE3/рЕТ23-а(+)/PrxVHum Δ 178 – продуцента N-концевого фрагмента пероксиредоксина VI человека, обеспечивающего синтез N-концевого фрагмента PrxVHum размером 179 аминокислотных остатков (PrxVHum Δ 178) с уровнем экспрессии в 30% от суммарного клеточного белка (30 мг/л культуральной жидкости).